



Relazione Tecnico-Scientifica

SAGGI BIOLOGICI EFFETTUATI SU SANIFICATORI A LAMPAD E UVC “Habit”

In merito al contratto di servizio per lo svolgimento dell'attività di esecuzione di test biologici, nell'analisi dei risultati e nella produzione di documenti atti a individuare e sviluppare le migliori condizioni per riscontrare la massima efficacia igienizzante dei dispositivi “Habit”, stipulato tra il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste e la società Effe Prototipi Srl, sono stati effettuati dei saggi per indagare l'effetto germicida di due sanificatori a lampada UVC:

- **Habit Pocket**, dedicato alla sterilizzazione di dispositivi telefonici o altri oggetti di piccole dimensioni, dotato di una lampada UVC centrale di 4 Watt di potenza.
- **Habit Desk**, dedicato alla sterilizzazione di oggetti di maggiori dimensioni, dotato di 2 lampade UVC da 18 Watt disposte ai lati della parete superiore (una lampada produttrice di ozono), ed è rivestito internamente da uno strato riflettente specchiato.

Messa a punto del protocollo di analisi:

Sono state utilizzate delle colture batteriche in liquido di ceppi batterici di riferimento, in particolare *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™).

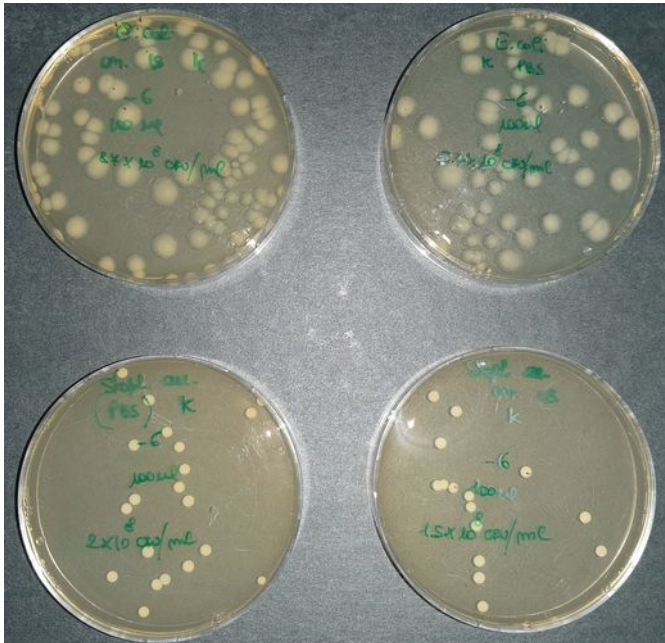
I ceppi sono stati prima seminati su piastra, per verificare le loro caratteristiche colturali, inoculati successivamente in 10 ml di brodo LB ed incubati per 24 h alla temperatura di 37°C. Un volume di 4 ml di colture batteriche in fase stazionaria è stato centrifugato a 4000 rpm per 10' a +4°C, per eliminare i residui metabolici del brodo di coltura, sono stati effettuati due lavaggi consecutivi con lo stesso volume di una soluzione di PBS sterile, infine il pellet è stato risospeso in 4 ml di PBS.

Sono state eseguite delle conte vitali, diluendo i batteri per poterli contare, dalle colture lavate e risospese in PBS. Le diluizioni sono state eseguite in provette contenenti 990 µL di PBS a cui sono stati aggiunti 10 µL di coltura batterica - (serie di dil. 1/100- diluizioni -2, -4, -6).

Un volume di 100 µL delle opportune diluizioni batteriche sono stati depositati su piastre contenenti terreno LB agar e fatti adsorbire al terreno con l'ausilio di spatole di vetro (pasteur modificate al fuoco).



Culture di *Escherichia coli* e di *Staphylococcus aureus* - indicazione delle CFU (unità formanti colonie).

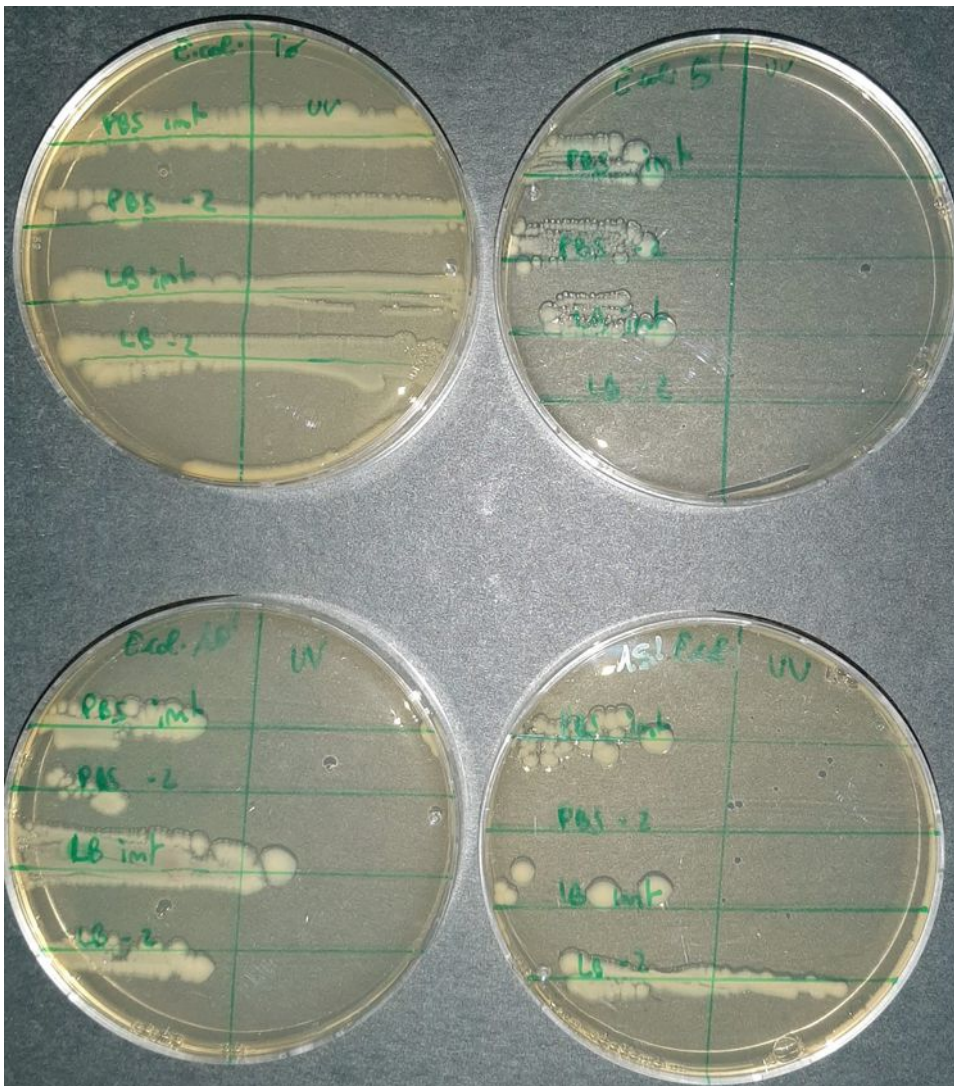


La quantità di batteri di *Escherichia coli*, dopo il lavaggio in PBS e la risospensione, è stata stimata in $5,7 \times 10^8$ batteri/ml e in 2×10^8 batteri/ml quella di *Staphylococcus aureus*.

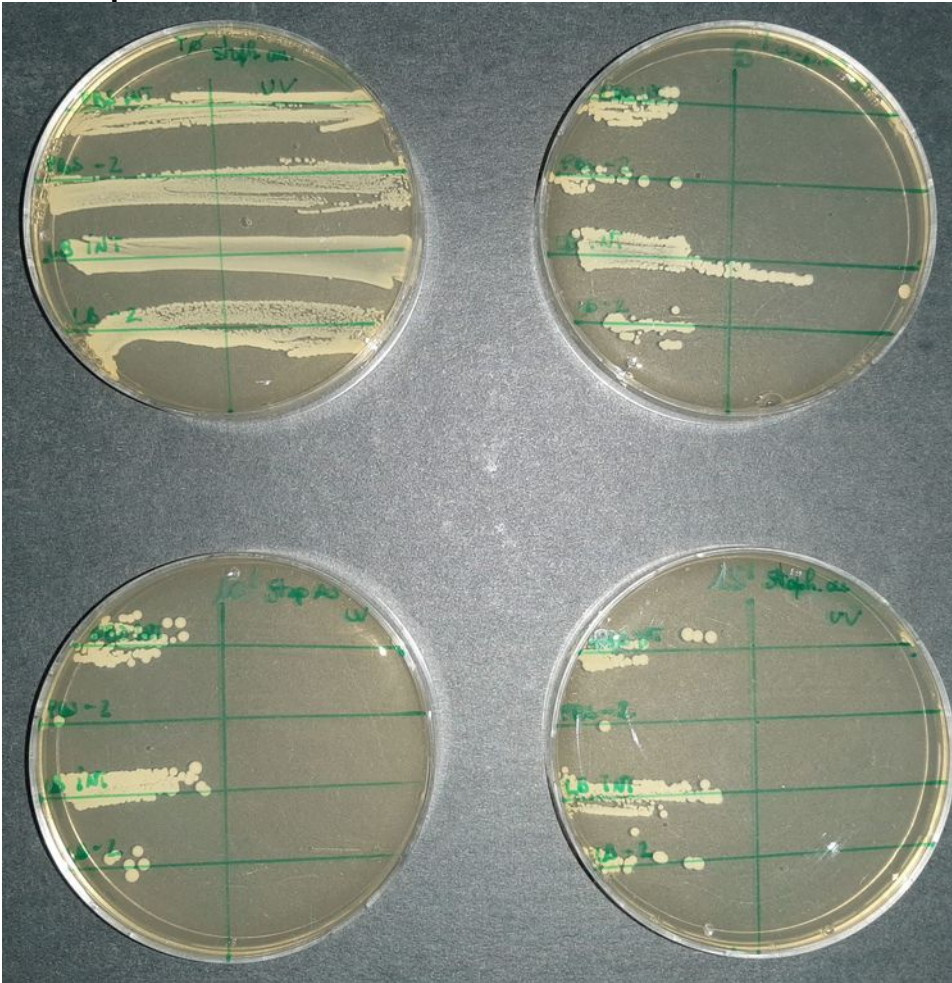


Strisci e risultato delle esposizioni agli UVC sulle colture batteriche

A seguire sono state eseguite delle semine con striscio su agar, metà della superficie di ogni piastra è stata irradiata con gli UVC, l'altra metà è stata schermata con un cartoncino ricoperto di carta di alluminio (stagnola). Gli strisci orizzontali sono stati eseguiti con concentrazioni di batteri di $n \times 10^8$ e di $n \times 10^6$. Il saggio è stato eseguito nel sanificatore Habit Desk, per valutare ciascun tempo indicativo di esposizione alle lampade UVC e all'ozono formato da una delle due lampade. I tempi di esposizione sono stati di 5', 10' e 15'. Dopo l'irradiazione le piastre sono state incubate per 24 h alla T di 37°C.



Escherichia coli



Staphylococcus aureus

Risultati:

T0 (controllo della crescita prima dell'esposizione agli UVC).

Evidenza della crescita batterica/inibizione successiva alle esposizioni ai tempi di irradiazione T5', T10', T15'.

Tutti i tempi di irradiazione agli UVC dimostrano efficacia ovvero inibizione della crescita batterica sulla parte esposta agli UVC. Si nota una leggera differenza tra le diverse concentrazioni di inoculo: gli UVC risultano più efficaci sulle concentrazioni di batteri inferiori (diluizione -2). L'ozono sembra agire ed inibire la zona degli strisci, maggiormente quelli diluiti, coperti dallo schermo per gli UVC, si notano infatti degli strisci meno densi rispetto al controllo al T0.



Sanificatore Habit Pocket

Sono state utilizzate delle colture batteriche in LB brodo dei ceppi di riferimento *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). Le colture, incubate per 24 h a 37°C, sono state preparate per essere utilizzate nel saggio, nel modo seguente:

sono stati prelevati 2 ml delle colture dei due ceppi di riferimento, centrifugati a 4000 rpm per 10' a +4°C, è stato eliminato il surnatante e risospeso il pellet con 2ml di soluzione sterile di PBS, centrifugati nuovamente nelle stesse condizioni, risospeso il pellet con 2 ml di PBS.

Di ogni preparazione è stata effettuata una diluizione 1/10 in PBS (1 ml di batteri + 9 ml di PBS), ed utilizzata in tutte le fasi sperimentali.

T0 - è stata effettuata una conta vitale della preparazione iniziale, inoculando 100 µL di coltura batterica delle diluizioni -4 e -6 su terreno LB in piastra.

Sono stati individuati i seguenti tempi di esposizione agli UVC : T5' T10' e T15' .

Per il saggio è stata utilizzata la superficie, pulita con etanolo, di un telefono cellulare collocato nel vano all'interno del sanificatore e sottoposto all'irradiazione diretta con la lampada. La coltura batterica è stata depositata anche sotto la base interna del sanificatore, su una striscia di parafilm, coperta dal cellulare, ai fini di valutare l'efficacia dell'ozono ed escludendo la luce diretta degli UVC.

Per ogni saggio sono stati depositati 200 µL di coltura batterica sopra e sotto il cellulare, precisamente in 3 punti (posizione 1, posizione 2, posizione 3) per ogni ceppo batterico, come da schema :

Superficie del cellulare

<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
1 2	2 1

Base interna del sanificatore

<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
3	3



Di ogni punto, per ogni tempo di esposizione e dopo aver riportato a volume, sono stati prelevati 100 µL delle gocce depositate ed inoculati su LB agar tramite spatolamento con pasteur di vetro modificate ad ansa, per far adsorbire il liquido sulla superficie del terreno. Inoltre sono stati prelevati ulteriori volumi di 10 µL dalle gocce, per procedere alle diluizioni e rendere contabile il numero di batteri presenti, eventualmente resistenti all'azione degli UVC.

RISULTATI:

1° saggio effettuato in data 09/02/21

Tempo di esposizione	<i>E. coli</i> conte vitali	Concentrazione CFU/ml <i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> conte vitali	Concentrazione CFU/ml <i>S. aureus</i>
T 0	-4 530 -6 13	5,30x10 ⁷ 1,3x10 ⁸	-4 640 -6 5	6,4x10 ⁷ 5x10 ⁷
T 5' pos.1	Int 210 -2 36 -4 0 -6 0	2x10 ³ 3,6x10 ⁴ 0 0	Int 800 -2 300 -4 4 -6 0	8x10 ⁴ 3x10 ⁵ 4x10 ⁵ 0
T 5' pos.2 NB: posizione centrale davanti alla lampada UV	Int 0 -2 0 -4 0 -6 0	0 0 0 0	Int 0 -2 0 -4 0 -6 0	0 0 0 0
T 5' pos.3	Int 114 -2 2 -4 0 -6 0	1,14x10 ³ 2x10 ³ 0 0	Int 0 -2 0 -4 0 -6 0	0 0 0 0
T 10' pos. 1 pos. 2 pos. 3	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0
T 15' pos. 1 pos. 2 pos. 3	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0



2° saggio effettuato in data 16/02/21

Tempo di esposizione	<i>E.coli</i> conte vitali	Concentrazione CFU/ml <i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i> conte vitali	Concentrazione CFU/ml <i>S.aureus</i>
T 0	-4 508 -6 11	5,8x10 ⁷ 1,1x10 ⁷	-4 204 -6 3	2,04x10 ⁷ 3x10 ⁷
T 5' pos.1	Int non contabili -2 194 -4 3 -6 0	Non contabili 1,9x10 ⁵ 3x10 ⁵ 0 0	Int 720 -2 540 -4 4 -6 1	7,2x10 ³ 5,4x10 ⁵ 4x10 ⁵ 1x10 ⁶
T 5' pos.2 NB: posizione centrale davanti alla lampada UV	Int 16 -2 0 -4 0 -6 0	1,6x10 ² 0 0 0	Int 30 -2 0 -4 0 -6 0	3x10 ² 0 0 0
T 5' pos.3	Int 0 -2 0 -4 0 -6 0	0 0	Int 0 -2 0 -4 0 -6 0	0 0 0 0
T 10' pos. 1 pos. 2 pos. 3	Int. 0 Int. 0 Int. 1	0 0 1x10 ¹	Int. 1 Int. 0 Int. 0	10 0 0
T 15' pos. 1 pos. 2 pos. 3	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0



3° saggio effettuato in data 19/02/21

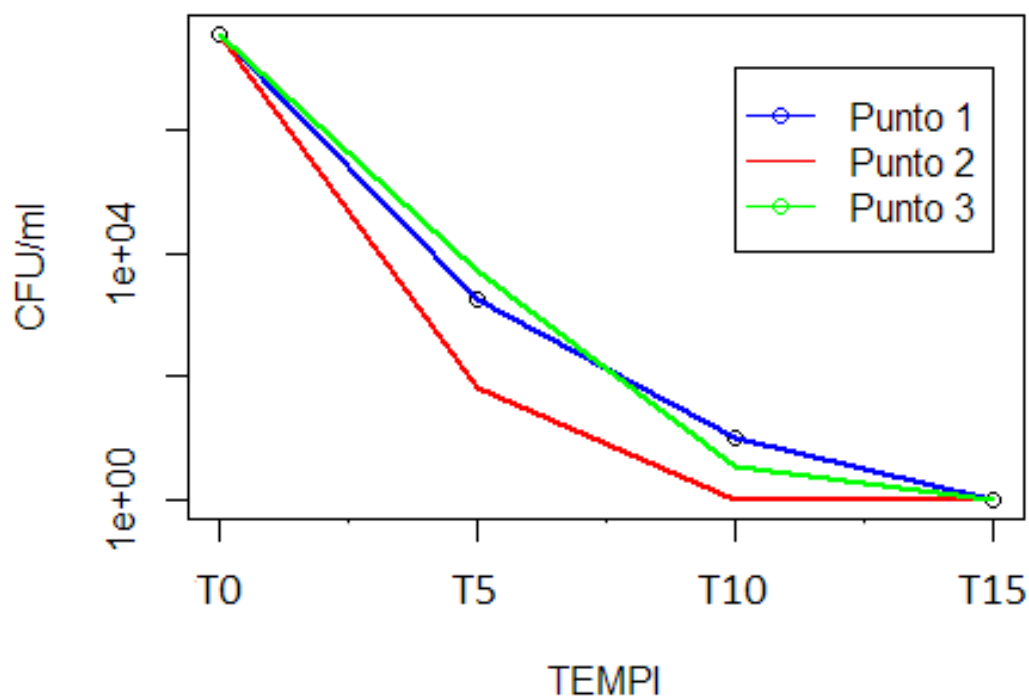
Tempo di esposizione	<i>E.coli</i> conte vitali	Concentrazione CFU/ml <i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i> conte vitali	Concentrazione CFU/ml <i>S.aureus</i>
T 0	-4 430 -6 3	4,3x10 ⁷ 3x10 ⁷	-4 40 -6 0	4x10 ⁶ 0
T 5' pos.1	Int 632 -2 34 -4 0 -6 0	6,32x10 ³ 3,4x10 ⁴ 0 0	Int 720 -2 41 -4 0 -6 0	7,2x10 ³ 4,1x10 ⁴ 0 0
T 5' pos.2 NB: posizione centrale davanti alla lampada UV	Int 4 -2 1 -4 0 -6 0	4x10 ¹ 1x10 ³ 0 0	Int 0 -2 0 -4 0 -6 0	0 0 0 0
T 5' pos.3	Int 460 -2 12 -4 0 -6 0	4,6x10 ³ 1,2 x10 ⁴	Int 262 -2 0 -4 0 -6 0	2,62x10 ³ 0 0 0
T 10' pos. 1 pos. 2 pos. 3	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0
T 15' pos. 1 pos. 2 pos. 3	Int. 0 Int. 0 Int. 0	0 0 0	Int. 2 Int. 0 Int. 1	2x10 ¹ 0 1x10 ¹



I dati relativi alle conte vitali batteriche delle repliche sperimentali sono stati mediati ed esposti nelle tabelle e nei grafici seguenti (scala logaritmica).

MEDIA REPLICHE SPERIMENTALI DI <i>Escherichia coli</i> (CFU/ml)			
	P1	P2	P3
T0	$3,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$
T5	$1,7 \times 10^4$	$6,6 \times 10^1$	$5,3 \times 10^3$
T10	1×10^1	0	3,3
T15	0	0	0

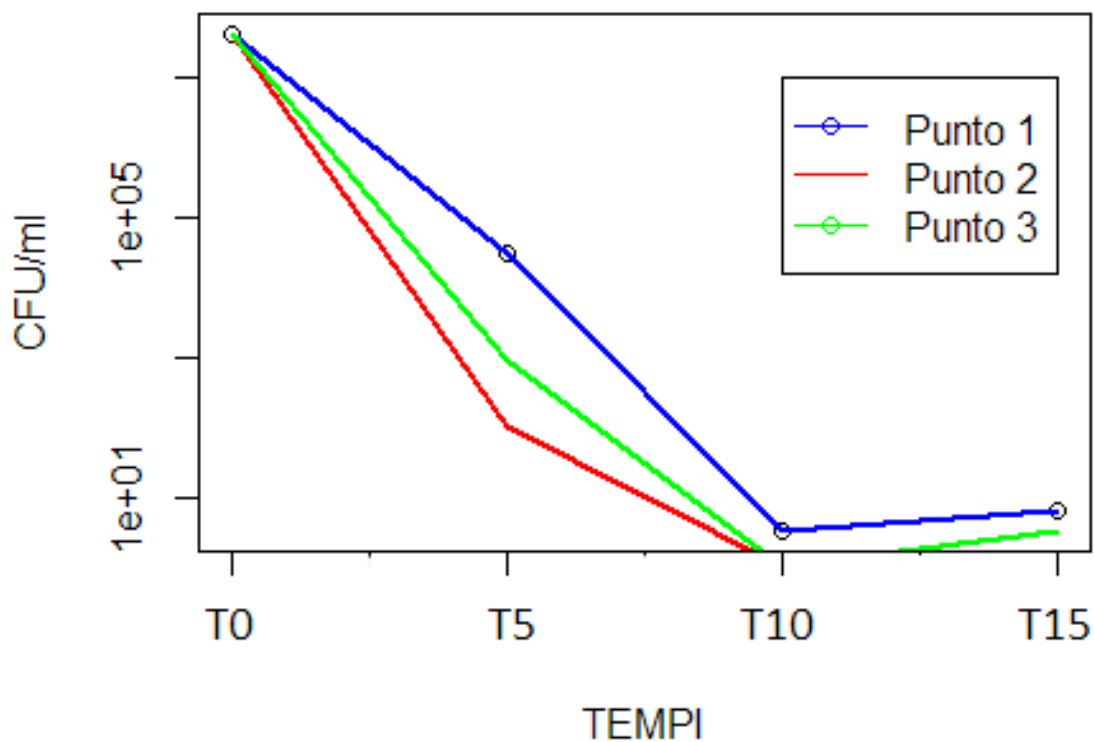
SANIFICATORE PICCOLO *E.coli*





MEDIA REPLICHE SPERIMENTALI DI <i>Staphylococcus aureus</i> (CFU/ml)			
	P1	P2	P3
T0	$4,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$
T5	$3,1 \times 10^4$	1×10^2	$8,7 \times 10^2$
T10	3,3	0	0
T15	6,6	0	3,3

SANIFICATORE PICCOLO *Staph.aureus*





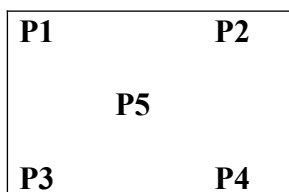
Sanificatore Habit Desk

Sono state utilizzate delle colture batteriche in LB brodo dei ceppi di riferimento *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). Le colture, incubate per 24 h a 37°C, sono state preparate per essere utilizzate nel saggio, nel modo seguente: sono stati prelevati 2 ml delle colture dei due ceppi di riferimento, centrifugati a 4000 rpm per 10' a +4°C, eliminato il surnatante, risospeso il pellet con 2ml di soluzione sterile di PBS, centrifugati nuovamente nelle stesse condizioni, risospeso il pellet con 2 ml di PBS.

E' stata effettuata una diluizione 1/10 in PBS (1 ml di batteri + 9 ml di PBS), questa aliquota è stata utilizzata in tutte le fasi sperimentali. T0 - è stata effettuata una conta vitale della preparazione iniziale, inoculando 100 µL di coltura batterica delle diluizioni -4 e -6 su terreno LB in piastra.

Sono stati individuati i seguenti tempi di esposizione agli UVC : T5' - T10' - T15' - T 20'.

Per ogni saggio sono stati depositati 200 µL di coltura batterica all'interno di piastrellini in polistirene per colture cellulari, del diametro di 3,5 cm; sono stati scelti 5 punti di test sulla base del sanificatore (posizione 1, posizione 2, posizione 3, posizione 4, posizione 5) per ogni ceppo batterico, come da schema :



Di ogni punto, per ogni tempo di esposizione, sono stati prelevati 100 µL del volume depositato ed inoculati su LB agar tramite spatolamento con pasteur di vetro modificate ad ansa, per far adsorbire il liquido sulla superficie del terreno. Inoltre sono stati prelevati ulteriori volumi di 10 µL dalle gocce, per procedere alle diluizioni e rendere contabile il numero di batteri presenti, eventualmente resistenti all'azione degli UVC.



RISULTATI:

1° saggio effettuato in data 10/02/21- *E.coli*

Tempo di esposizione	conte / CFU/ml									
T 0	-4	500 5x10 ⁷								
	-6	4 4x10 ⁷								
Tempo di esposizione	Posizione 1 conte cfu/ml		Posizione 2 conte cfu/ml		Posizione 3 conte cfu/ml		Posizione 4 conte cfu/ml		Posizione 5 conte cfu/ml	
T 5' <i>E.coli</i>	Int 15	1.5x10 ⁷	Int 25	2.5x10 ²	Int 0	0	Int 4	4x10 ¹	Int 22	2.2x10 ²
	-2	0 0	-2	0 0	-2	0 0	-2	0 0	-2	0 0
	-4	0 0	-4	0 0	-4	0 0	-4	0 0	-4	0 0
T 10' <i>E.coli</i>	Int 7	7x10 ¹	Int 3	3x10 ¹	Int 0	0	Int 6	6x10 ¹	Int 255	2.55x10 ³
	-2	0 0	-2	0 0	-2	0 0	-2	1 1x10 ³	-2	1 1x10 ³
T 15' <i>E.coli</i>	Int 0	0	Int 0	0	Int 1	1x10 ³	Int 0	0	Int 16	1.6x10 ²
T 20' <i>E.coli</i>	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 1	1 x10 ¹

2° saggio effettuato in data 16/02/21- *E.coli*

Tempo di esposizione	conte / CFU/ml									
T 0	-4	450 4,5x10 ⁷								
	-6	21 2,1x10 ⁸								
Tempo di esposizione	Posizione 1 conte cfu/ml		Posizione 2 conte cfu/ml		Posizione 3 conte cfu/ml		Posizione 4 conte cfu/ml		Posizione 5 conte cfu/ml	
T 5' <i>E.coli</i>	Int 0	0	Int 29	2.9x10 ²	Int 17	1.7x10 ²	Int 65	6,5x10 ²	Int 2	2 x10 ¹
	-2	0 0	-2	1 1 x10 ³	-2	2 2 x10 ³	-2	1 1 x10 ³	-2	0 0
	-4	0 0	-4	0 0	-4	0 0	-4	0 0	-4	0 0
T 10' <i>E.coli</i>	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0
	-2	0 0	-2	0 0	-2	0 0	-2	0 0	-2	0 0
T 15' <i>E.coli</i>	Int 0	0	Int 0	0	Int 7	7 x10 ¹	Int 0	0	Int 0	0
T 20' <i>E.coli</i>	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0



3° saggio effettuato in data 19/02/21- *E.coli*

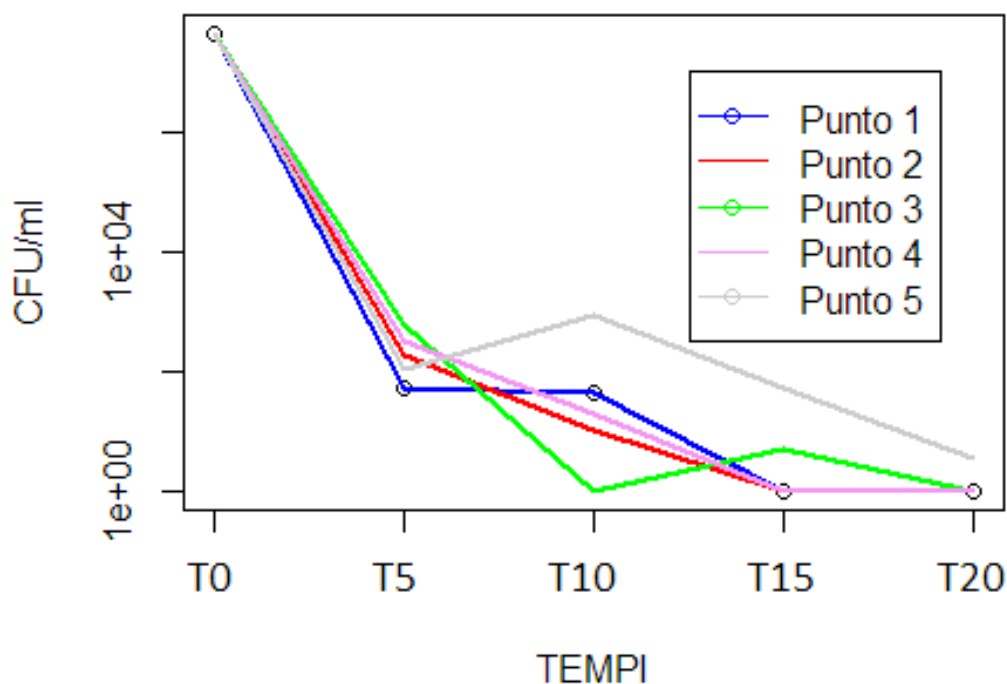
Tempo di esposizione	conte / CFU/ml										
T 0	-4 320 $3,2 \times 10^7$ -6 10 1×10^8										
Tempo di esposizione	Posizione 1 conte cfu/ml			Posizione 2 conte cfu/ml		Posizione 3 conte cfu/ml		Posizione 4 conte cfu/ml		Posizione 5 conte cfu/ml	
T 5' <i>E.coli</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0
	-2 0	0	0	-2 0	0	-2 0	0	-2 0	0	-2 0	0
	-4 0	0	0	-4 0	0	-4 0	0	-4 0	0	-4 0	0
T 10' <i>E.coli</i>	Int 6	6×10^1	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0
	-2 0	0	0	-2 0	0	-2 0	0	-2 0	0	-2 0	0
T 15' <i>E.coli</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	Int 7	7×10^1	Int 0	0	Int 0	0
T 20' <i>E.coli</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0	Int 0	0



I dati relativi alle conte vitali batteriche delle repliche sperimentali sono stati mediati ed esposti nella tabella e nel grafico seguente (scala logaritmica).

MEDIA REPLICHE SPERIMENTALI DI <i>Escherichia coli</i> (CFU/ml)					
	P1	P2	P3	P4	P5
T0	$4,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$
T5	50	$1,8 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
T10	$4,3 \times 10^1$	10	0	$2,0 \times 10^1$	$8,5 \times 10^2$
T15	0	0	5	0	$5,3 \times 10^1$
T20	0	0	0	0	3,3

SANIFICATORE GRANDE *E. coli*





1° saggio effettuato in data 10/02/21- *S.aureus*

Tempo di esposizione	<i>S.aureus</i> conte vitali e concentrazione CFU /ml														
T 0	-4 256 2.56×10^7 -6 3 3×10^7														
Tempo di esposizione	Posizione 1 conte cfu/ml			Posizione 2 conte cfu/ml			Posizione 3 conte cfu/ml			Posizione 4 conte cfu/ml			Posizione 5 conte cfu/ml		
T 5' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 1	1	1×10^1
	-2 2	2	2×10^3	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0
	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0
T 10' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 8	8	8×10^1	Int 0	0	0	Int 0	0	0
	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0
T 15' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0
T 20' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 2	2	2×10^1	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0

2° saggio effettuato in data 16/02/21- *S.aureus*

Tempo di esposizione	<i>S.aureus</i> conte vitali e concentrazione CFU /ml														
T 0	-4 168 $1,68 \times 10^7$ -6 2 2×10^7														
Tempo di esposizione	Posizione 1 conte cfu/ml			Posizione 2 conte cfu/ml			Posizione 3 conte cfu/ml			Posizione 4 conte cfu/ml			Posizione 5 conte cfu/ml		
T 5' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 1	1	1×10^1	Int 0	0	0
	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0
	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0
T 10' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 2	2	2×10^1	Int 0	0	0
	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0
T 15' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0
T 20' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 2	2	2×10^1	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0



3° saggio effettuato in data 19/02/21- riferimento *S.aureus*

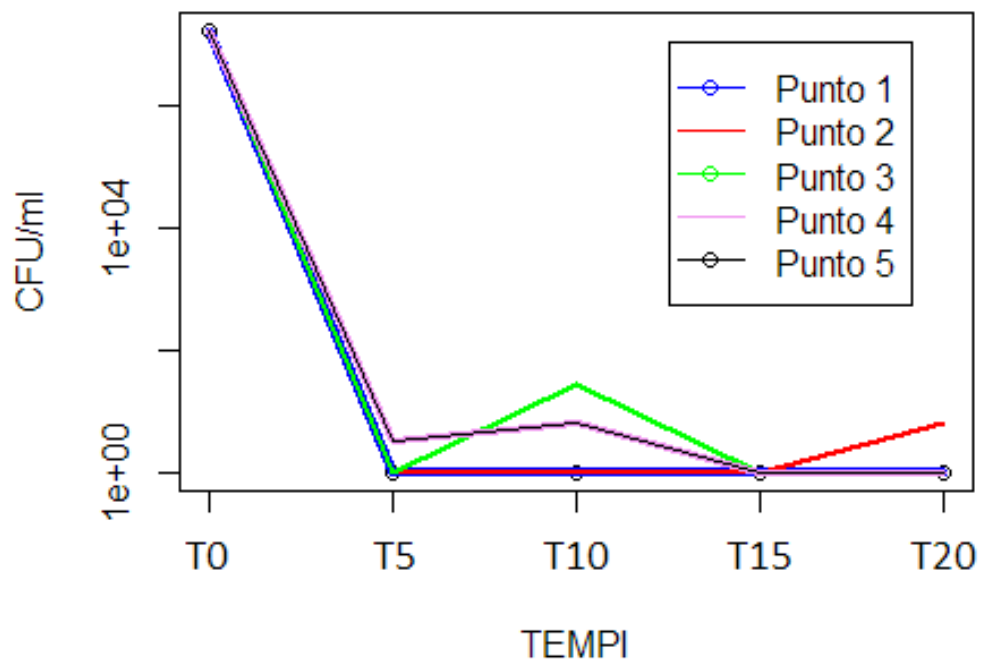
Tempo di esposizione	<i>S.aureus</i> conte vitali e concentrazione CFU /ml																	
T 0	-4 53 5.3 x10 ⁶ -6 0 0																	
Tempo di esposizione	Posizione 1 conte cfu/ml			Posizione 2 conte cfu/ml			Posizione 3 conte cfu/ml			Posizione 4 conte cfu/ml			Posizione 5 conte cfu/ml					
T 5' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0
	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0
	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0	-4 0	0	0
T 10' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 2	2x10 ¹	0
	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0	-2 0	0	0
T 15' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0
T 20' <i>S.aureus</i>	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0	Int 0	0	0



I dati relativi alle conte vitali batteriche delle repliche sperimentali sono stati mediati ed esposti nella tabella e nel grafico seguente (scala logaritmica).

MEDIA REPLICHE SPERIMENTALI DI <i>Staphylococcus aureus</i> (CFU/ml)					
	P1	P2	P3	P4	P5
T0	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
T5	0	0	0	3,3	3,3
T10	0	0	$2,7 \times 10^1$	6,7	6,7
T15	0	0	0	0	0
T20	0	6,7	0	0	0

SANIFICATORE GRANDE *Staph.aureus*





Saggio di vitalità batterica su tessuto dopo l'irradiazione con UVC

Sono state utilizzate delle colture batteriche in LB brodo dei ceppi di riferimento *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). Le colture, incubate per 24 h a 37°C, sono state preparate per essere utilizzate nel saggio, nel modo seguente: sono stati prelevati 2 ml delle colture dei due ceppi di riferimento, centrifugati a 4000 rpm per 10' a +4°C, è stato eliminato il surnatante, risospeso il pellet con 2ml di soluzione sterile di PBS, centrifugati nuovamente nelle stesse condizioni, risospeso il pellet con 2 ml di PBS.

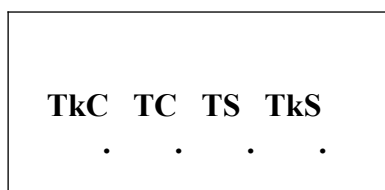
Della preparazione è stata effettuata una diluizione 1/10 in PBS (1 ml di batteri + 9 ml di PBS), questa aliquota è stata utilizzata in tutte le fasi sperimentali.

- TK 0 - è stata effettuata una conta vitale della preparazione iniziale, inoculando 100 µL di coltura batterica delle diluizioni -4 e -6 su terreno LB in piastra.
- T0 - un pezzo di tessuto sterile di cotone bianco, di dimensione 2 cm x2 cm, inserito in un piastrellino di polistirene sterile, è stato imbibito con 200 µL di coltura batterica preparata.

La tessuto è stata poi prelevata ed inserita in una provetta contenente 1800 µL di PBS. In questa maniera si è favorita la dispersione dei batteri presenti nella tessuto e contemporaneamente sono stati diluiti di un fattore 10. Sono stati quindi prelevati 100 µL di questa soluzione, ulteriormente diluiti e piastrati su terreno. Infine anche il pezzo di tessuto è stato appoggiato su agar per verificare la crescita batterica.

Sono stati individuati i seguenti tempi di esposizione agli UVC : T5' - T10' - T15' - T 20'.

Per ogni tempo di esposizione sono stati trattati i batteri in brodo depositati su piastrellino e depositati parallelamente sulla tessuto , come da schema seguente:



TkC	200 µL di coltura di <i>Escherichia coli</i> su piastrellino
TC	200 µL di coltura di <i>Escherichia coli</i> su tessuto
TS	200 µL di coltura di <i>Staphylococcus aureus</i> su tessuto
TkS	200 µL di coltura di <i>Staphylococcus aureus</i> su piastrellino



Dopo l'irradiazione nei tempi stabiliti sono stati eseguiti i prelievi, le opportune diluizioni e le rispettive semine su agar. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 h e valutate nella crescita batterica.

Risultati del saggio effettuato in data 02/03/2021 su tessuto - *E.coli*

Tempo di esposizione	<i>E.coli</i> conte vitali	CFU/ml <i>E.coli</i>	Tempo di esposizione	<i>E.coli</i> conte vitali	CFU/ml <i>E.coli</i>
T 0 TkC piastrellino	-4 520 -6 20	5,20x10 ⁷ 2x10 ⁸	T 0 TC tessuto	-3 non contabili -5 86	NC 8,6x10 ⁷
T 5' TkC piastrellino	Int 1 -2 1	1x10 ¹ 1x10 ³	T 5' TC tessuto	-1 368 -2 56	13,68x10 ⁴ 5,6x10 ⁴
T 10' TkC piastrellino	Int 0	0	T 10' TC tessuto	-1 337	3,37x10 ⁴
T 15' TkC piastrellino	Int 0	0	T 15' TC tessuto	-1 224	2,24x10 ⁴
T 20' TkC piastrellino	Int 0	0	T 20' TC tessuto	-1 113	1,13x10 ⁴



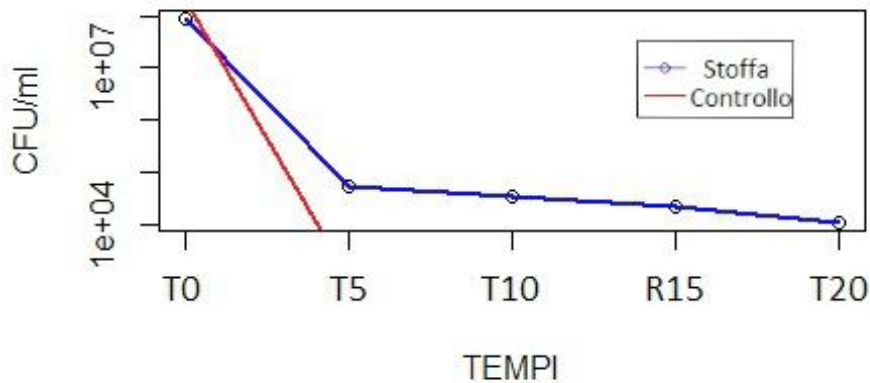
Conte vitali di *E.coli* nei tempi T0, T5', T10', T15', T20'

Tessuto su piastra	Conte da tessuto (TC)	Conte da brodo di batteri (TkC)



Abbattimento della carica batterica di *E.coli* - confronto tessuto e brodo batterico

Stoffa - *E.coli*



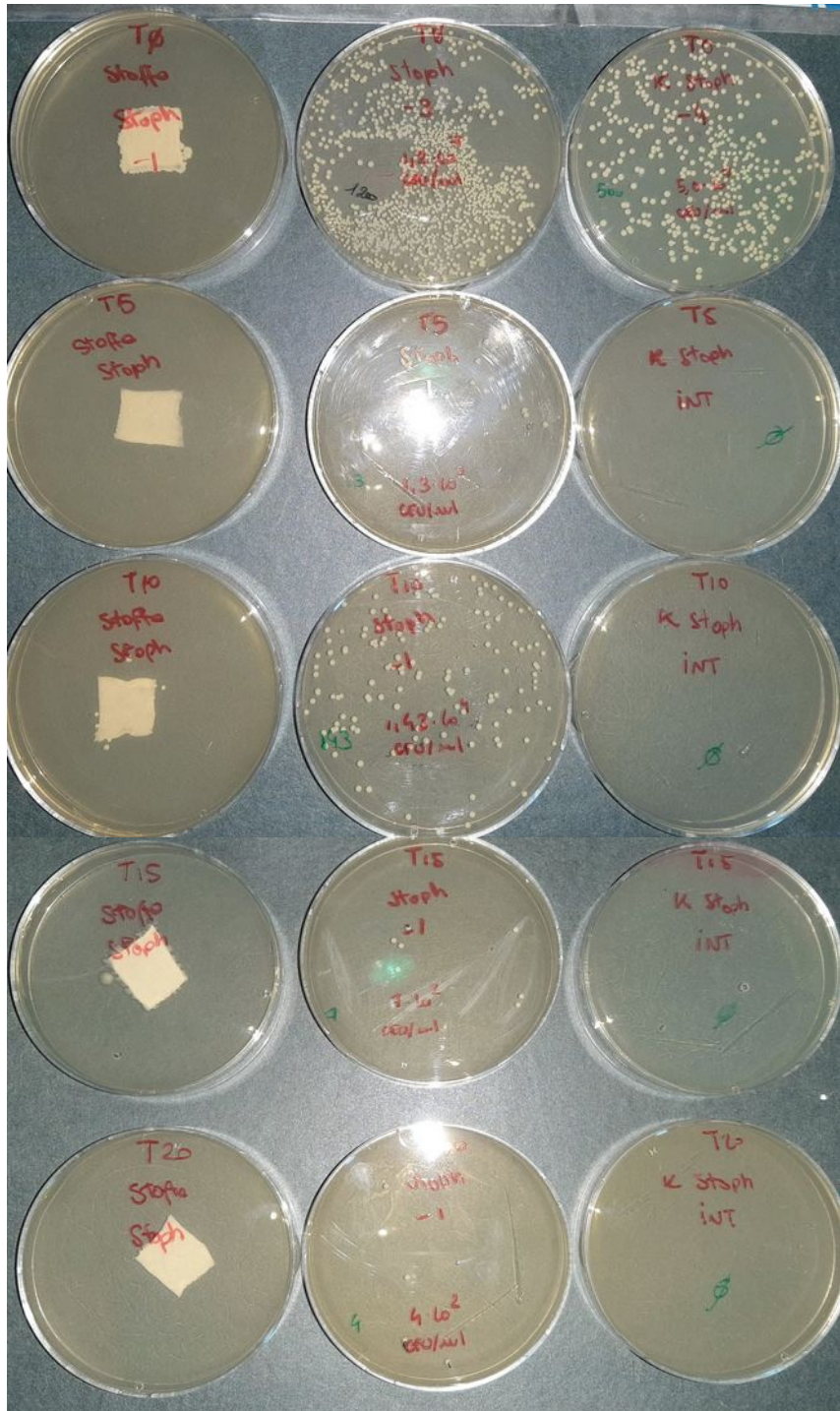
Risultati del saggio effettuato in data 02/03/2021 su tessuto - *S.aureus*

Tempo di esposizione	<i>S.aureus</i> conte vitali	CFU/ml <i>S.aureus</i>	Tempo di esposizione	<i>S.aureus</i> conte vitali	CFU/ml <i>S.aureus</i>
T 0 TkS piastrellino	-4 500 -6 4	5x10 ⁷ - 4x10 ⁷	T 0 TS tessuto	-3 1200 ; -5 18	1,2x10 ⁷ 1,8x10 ⁷
T 5' TkS piastrellino	Int 0 -2 0	0 0	T 5' TS tessuto	-1 13 -2 0	1,3x10 ³ 0
T 10' TkS piastrellino	Int 0	0	T 10' TS tessuto	-1 143	1,43x10 ⁴
T 15' TkS piastrellino	Int 0 -	0	T 15' TS tessuto	-1 7	7x10 ²
T 20' TkS piastrellino	Int 0	0	T 20' TS tessuto	-1 4	4x10 ²



Conte vitali di *S.aureus* nei tempi T0, T5', T10', T15', T20'

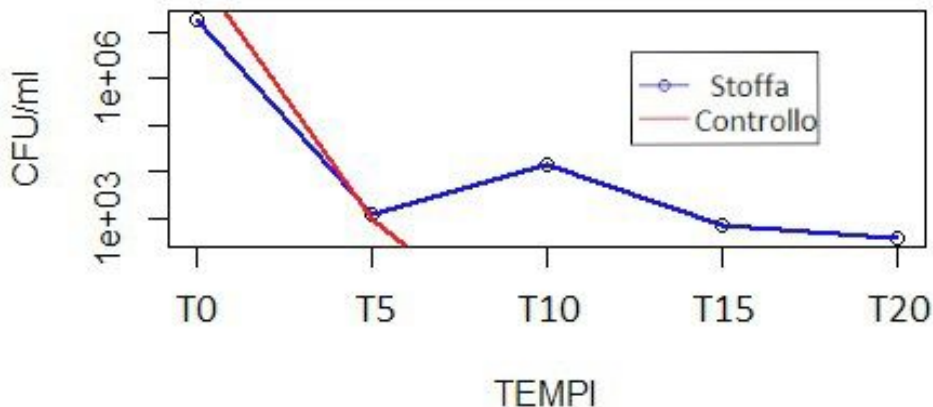
tessuto su piastra	Conte da tessuto (TC)	Conte da brodo di batteri (TKC)
--------------------	-----------------------	---------------------------------





Abbattimento della carica batterica di *S.aureus* - confronto tessuto e brodo batterico

Stoffa-Staph.au



Conclusioni:

Come si nota nei grafici, l'abbattimento della carica batterica è maggiore all'esposizione delle brodoculture di entrambe le specie batteriche saggate rispetto all'inoculo nelle stesse concentrazioni, fatto assorbire dalla tessuto. L'esposizione di 5' dello *S.aureus* e di 10' dell'*E. coli* agli UVC del sanificatore Habit Desk sono sufficienti ad abbattere completamente le cariche batteriche, mentre la tessuto, di cotone di colore bianco, sembra avere un effetto schermante che abbassa di un fattore 10^5 dopo un'esposizione di 20' la carica batterica di *S.aureus* e di un fattore 10^3 quella di *E.coli*.



Esposizione agli UVC di DNA batterico

I brodi in coltura dei ceppi di riferimento *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA genomico da esporre all'azione degli UVC del sanificatore Habit Pocket. L'estrazione è stata eseguita con E.Z.N.A.® Universal Pathogen Kit | Omega Bio-tek, partendo da 4 ml coltura e seguendo il protocollo del Kit. Il DNA ottenuto è stato risospeso in 100 µL di Elution Buffer e quantificato con il kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit con lo strumento Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Quantificazione del DNA:

E.coli ATCC 25922 33,7 ng/µL

S.aureus ATCC 25923 11,5 ng/µL

Sono state preparate delle aliquote di 100 ng di DNA in un volume di 20 µL e sottoposte ai tempi stabiliti T5', T10', T15' all'esposizione degli UVC nel sanificatore Habit Pocket e ai tempi T5', T10', T15' e T20' all'esposizione degli UVC nel sanificatore Habit Desk.

Le gocce con 20 µL di DNA sono state depositate su piastrellini sterili in polistirene; dopo l'irradiazione è stato controllato il volume di liquido evaporato e ripristinato il volume iniziale di 20 µL con acqua sterile per PCR, e successivamente trasferito in una provetta, posta in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo.

3 µL di ogni campione esaminato, pari a 15ng di DNA, sono stati sottoposti alla RT PCR, utilizzando dei primer specifici per due regioni ipervariabili 16S rRNA e in particolare la regione V4(515F- 806R) e la regione V2 (27F-806R), con il seguente il protocollo :

Regione V4 (circa 300bp) del 16S rRNA, mix per un volume di 15 µL:

7,5 µL AccuStartII PCR ToughMix 2X (Quanta Bio),

0,75 µL EvaGreen™ 20X (Biotium),

0,8µL 515 F (10µM)

0,8 µL 806 R (10µM)

3 µL di DNA templato

2,15 µL di acqua per PCR



Regione V2-V4 (circa 800bp) del 16S rRNA, mix per un volume di 15 µL: :

7,5 µL AccuStartII PCR ToughMix 2X (Quanta Bio),

0,75 µL EvaGreen™ 20X (Biotium),

0,8µL 27 F (10µM)

0,8 µL 806 R (10µM)

3 µL di DNA templato

2,15 µL di acqua per PCR

L'amplificazione è stata effettuata nello strumento CFX 96™ PCR System (Bio-Rad) eseguendo 36 cicli di 94 °C per 20 s, 55 °C per 20 s, 72 °C per 60 s ed un'estensione finale di 4 °C per 5' (Cq= cicli di quantificazione).

Sanificatore Habit Pocket - real-time PCR della regione V4

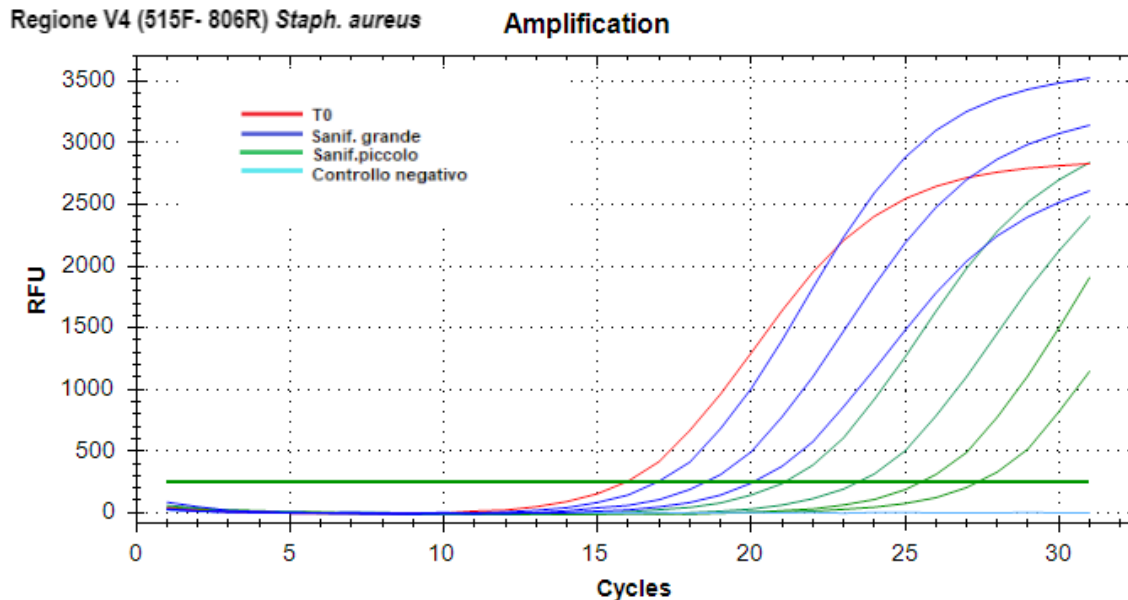
DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq	DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq
P- <i>S.aureus</i> T0	17.41	P- <i>E.coli</i> T0	18.44
P- <i>S.aureus</i> T5'	18.41	P- <i>E.coli</i> T5'	20.04
P- <i>S.aureus</i> T10'	20.06	P- <i>E.coli</i> T10'	20.87
P- <i>S.aureus</i> T15'	21.66	P- <i>E.coli</i> T15'	23.38

Sanificatore Habit Desk - real-time PCR della regione V4

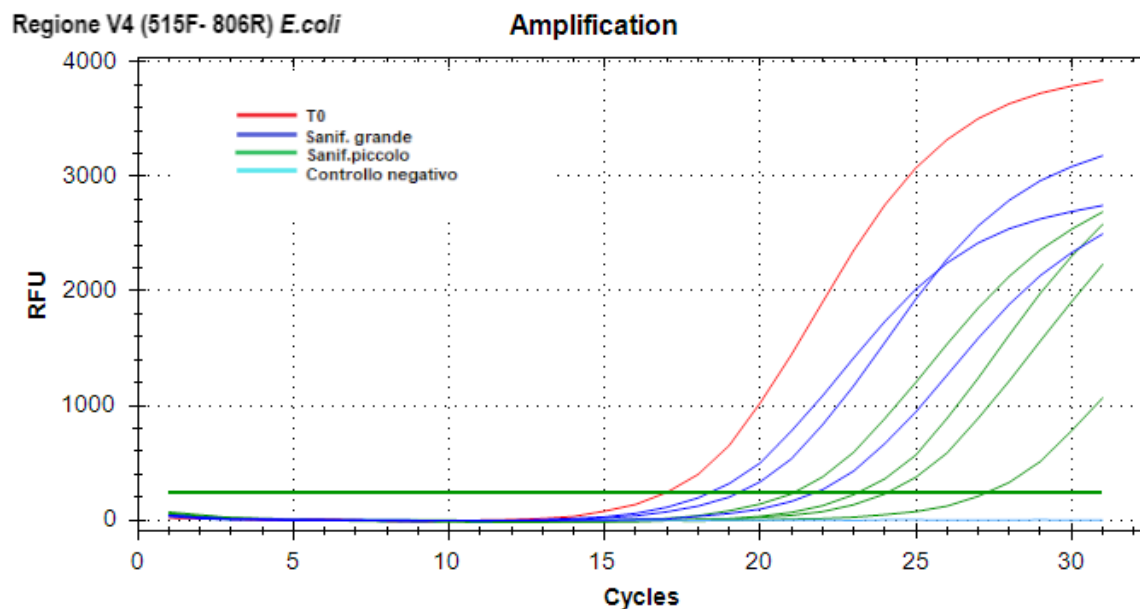
DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq	DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq
G- <i>S.aureus</i> T0	17.41	G- <i>E.coli</i> T0	18.44
G- <i>S.aureus</i> T5'	22.56	G- <i>E.coli</i> T5'	22.62
G- <i>S.aureus</i> T10'	25.03	G- <i>E.coli</i> T10'	24.71
G- <i>S.aureus</i> T15'	27.08	G- <i>E.coli</i> T15'	25.64
G- <i>S.aureus</i> T20'	28.95	G- <i>E.coli</i> T20'	28.99



Real time PCR della regione V4 di campioni di *S.aureus* trattati nei sanificatori Habit Pocket e Habit Desk



Real time PCR della regione V4 di campioni di *E.coli* trattati nei sanificatori Habit Pocket e Habit Desk



- --- DNA controllo T0
- ---campioni di DNA trattati nel sanificatore Habit Pocket
- ---campioni di DNA trattati nel sanificatore Habit Desk
- ---bianco reagenti – controllo negativo



Sanificatore Habit Pocket - real-time PCR della regione V2-V4

DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq	DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq
P- <i>S.aureus</i> T0	15.46	P- <i>E.coli</i> T0	16.54
P- <i>S.aureus</i> T5'	17.17	P- <i>E.coli</i> T5'	19.28
P- <i>S.aureus</i> T10'	22.42	P- <i>E.coli</i> T10'	26.12
P- <i>S.aureus</i> T15'	28.10	P- <i>E.coli</i> T15'	>35

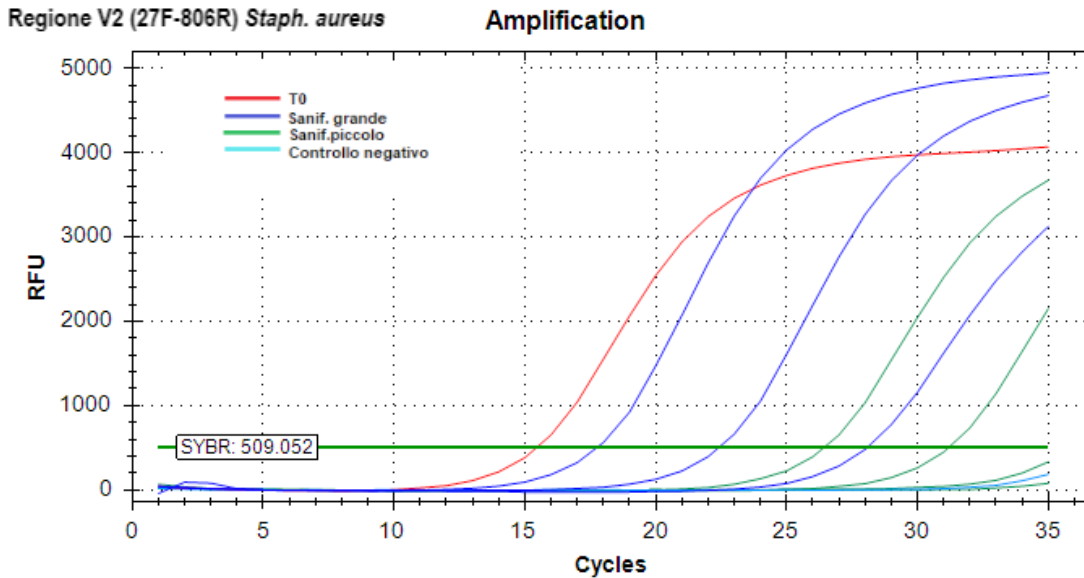
Sanificatore Habit Desk - real-time PCR della regione V2-V4

DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq	DNA saggiato e Tempi di esposizione	Valori di Cq
G- <i>S.aureus</i> T0	15.46	G- <i>E.coli</i> T0	16.54
G- <i>S.aureus</i> T5'	26.44	G- <i>E.coli</i> T5'	26.79
G- <i>S.aureus</i> T10'	31.21	G- <i>E.coli</i> T10'	30.66
G- <i>S.aureus</i> T15'	>35	G- <i>E.coli</i> T15'	34.25
G- <i>S.aureus</i> T20'	>35	G- <i>E.coli</i> T20'	>35

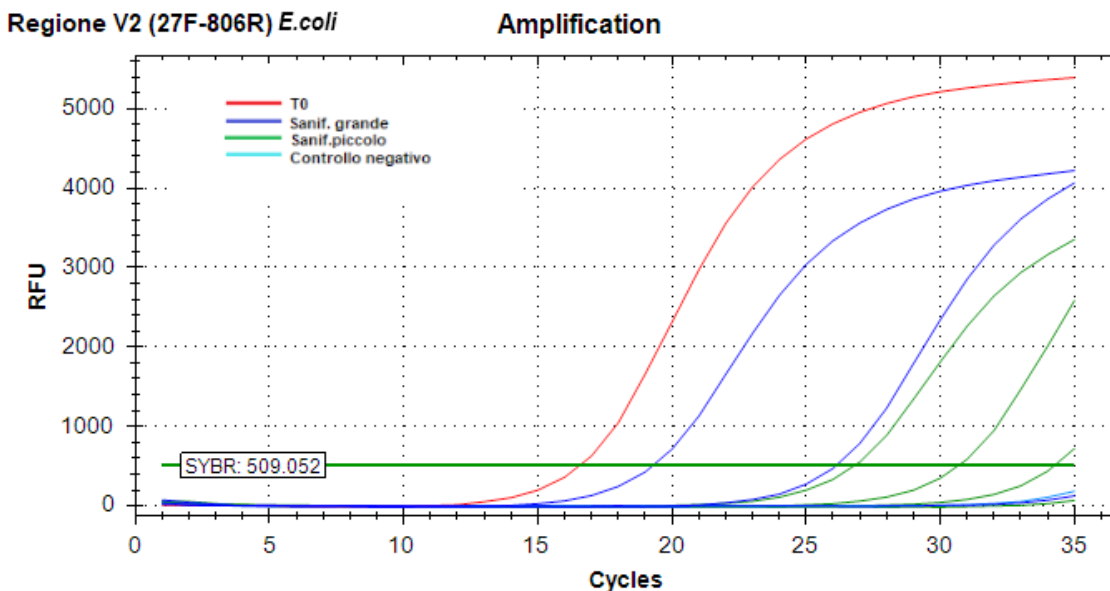
Un test di real-time PCR duplica e analizza specifiche sequenze di DNA. I primer V4 e V2-V4 mplificano sequenze rispettivamente di circa 300 paia di basi e 800 paia di basi. Il potere germicida della luce UV-C su batteri e virus è ben noto, questa proprietà è dovuta alla sua capacità di rompere i legami molecolari di DNA e RNA .



Real time PCR della regione V2-V4 di campioni di *S.aureus* trattati nei sanificatori Habit Pocket e Habit Desk



Real time PCR della regione V2-V4 di campioni di *E.coli* trattati nei sanificatori Habit Pocket e Habit Desk



- --- rosso DNA controllo T0
- ---campioni di DNA trattati nel sanificatore Habit Pocket
- ---campioni di DNA trattati nel sanificatore Habit Desk
- ---bianco reagenti – controllo negativo



Conclusioni:

Nella real-time PCR il valore Cq, ovvero quando il segnale inizia a crescere sopra il rumore di fondo, è inversamente proporzionale all'integrità del DNA stampo.

Quindi se il valore Cq è maggiore rispetto al controllo al tempo T0, significa che il DNA è stato frammentato per cui l'amplificazione funziona con minore efficacia. Nel caso del DNA di *E.Coli*, esposizioni di 15' nel sanificatore Habit Pocket e di 20' nel sanificatore Habit Desk producono dei danni che abbassano la probabilità di produrre degli amplificati pari a quella del bianco reagenti (cioè un controllo negativo costituito dal mix di reagenti privo del DNA stampo). *S.aureus* sembra più sensibile all'esposizione già a 15' al sanificatore Habit Desk.

Praticamente tutto il materiale genetico viene completamente degradato ai tempi di esposizione testati.

Valutazioni finali:

I dispositivi "Habit" forniti dalla Effe Prototipi Srl al Laboratorio di Genomica Applicata e Comparata del Dipartimento di Scienze della Vita per lo svolgimento dell'attività di esecuzione di test biologici atti a individuare e sviluppare le migliori condizioni per riscontrare la loro massima efficacia igienizzante si sono dimostrati in grado di abbattere la carica batterica vitale per entrambi i ceppi utilizzati. Inoltre tali dispositivi sono efficaci anche nel degradare gli acidi nucleici estendendo quindi la loro funzionalità ed attività inibitoria oltre agli organismi procariotici.

Trieste, 9 Marzo 2021

Docente di Genetica
Responsabile del Laboratorio di
Genomica Applicata e Comparata
<https://tinyurl.com/ACGLab-UNITS>